

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

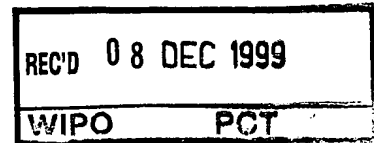
IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/DE 99 / 02816

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



DE 99 / 2816

Bescheinigung

EJW

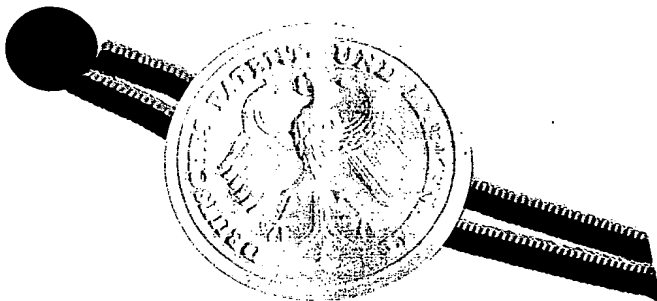
Die Anmelderin Privates Institut BioServ GmbH in Rostock/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung"

am 25. Mai 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht und erklärt, daß sie dafür die Innere Priorität der Anmeldung in der Bundesrepublik Deutschland vom 8. September 1998, Aktenzeichen 198 40 900.1, in Anspruch nimmt.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 07 K 16/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.



Aktenzeichen: 199 23 892.8

München, den 18. November 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Weihmayer

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

25.05.99

Belegexemplar
Das ist ein Belegexemplar

2

Diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer Pankreas- funktionsstörung

H.-W. Heinrich, R. Kleinert, U. Meyer, H.-J. Wagner

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung beschrieben. Das Ziel wird erfindungsgemäß durch die Verwendung von Teile aller Isoenzyme der Pankreas-Elastase und synthetischer Aminosäuresequenzen als Antigene für die Gewinnung spezifischer Antikörper und deren Verwendung in immunchemischen Testverfahren erreicht.

25.05.99
5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Funktionsstörungen der Bauchspeicheldrüse können das Ergebnis unterschiedlicher Erkrankungen sein, deren Diagnose unter anderem durch die Bestimmung funktioneller Kriterien untermauert werden sollte. Die häufigsten Erkrankungen des Pankreas sind die chronisch rezidivierende und die akute Pankreatitis.

Die chronische Pankreatitis ist eine schleichende progrediente Erkrankung, bei der das funktionstüchtige Pankreasgewebe im Rahmen eines sklerotisierenden Prozesses allmählich degeneriert. Sie ist charakterisiert durch ihr klinisches Beschwerdebild (abdominelle Schmerzen, Steatorrhoe, Gewichtsverlust), typische morphologische Veränderungen der Drüse (Verkalkungen, dilatierter, unregelmäßig begrenzter Ductus pancreaticus) sowie einen progredienten exokrinen und endokrinen Funktionsverlust (Maldigestion, Diabetes mellitus). Die chronische Pankreatitis hat eine Inzidenz von 6 bis 8 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern pro Jahr in Westeuropa. Die Diagnose der chronischen Pankreatitis wird wegen steigenden Alkoholkonsums immer häufiger gestellt.

Zur Untermauerung klinischer und morphologischer Befunde können verschiedene funktionelle Kriterien bestimmt werden. Die sensitivste Analysenmethode stellt der Sekretin-Caerulin- bzw. Sekretin-Cholezystokinin-Test dar, der jedoch den Patienten stark belastet und einen hohen Zeitaufwand erfordert. Als indirekte Testmethoden werden Lundh-, NBT-PABA- und Pancreoauryl-Test angewendet. Auch die Bestimmung von Trypsin im Serum oder Chymotrypsin im Stuhl haben eine gewisse praktische Bedeutung. Alle diese indirekten Testmethoden haben den Nachteil einer ungenügenden Spezifität.

Die Bestimmung der Elastase 1 ist von allen verfügbaren indirekten Funktionstesten der Test mit der höchsten Sensitivität und Spezifität (Löser, C., Therapie & Erfolg 1997; 1:411-413). Er hat sich in den letzten Jahren für die tägliche Praxis als Standard für die exokrinen Pankreasfunktionsdiagnostik durchgesetzt. Grundlage für diesen Test sind polyklonale Antikörpern gegen Elastase 1 (Elastase 1-RIA, Abbott) bzw. mono- und/oder polyklonalen Anti-Elastase-1-Antikörpern, die durch Immunisierung mit einem Antigen, das die Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly Asp-Ile-Arg oder immunologisch wirksame Teilpeptide davon enthält, gewonnen werden (EP 0 547 059 B1).

Pankreas-Elastase ist ein proteolytisches Verdauungsenzym. Im Vergleich zu den gebräuchlichen Parametern der Pankreasdiagnostik (z.B. Chymotrypsinaktivität im Stuhl) hat die quantitative Elastase-Bestimmung entscheidende Vorteile. Das Enzym wird ausschließlich im Pankreas gebildet und weist eine außergewöhnliche Stabilität während der Darmpassage auf, d.h., die Konzentration der Elastase spiegelt die Sekretionsleistung des Pankreas wieder.

Trotz Überlegenheit gegenüber anderen exokrinen Parametern wird mit dem herkömmlichen Elastase 1-ELISA in zu vielen Fällen Pankreas-Elastase nicht nachgewiesen, obwohl sie in beträchtlichen Konzentrationen vorhanden ist.

Ziel der Erfindung ist daher die Entwicklung eines sensitiveren Verfahrens zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung auf der Grundlage des Nachweises pankreatischer Elastase.

Durch systematische Untersuchung von Stuhlproben, die mit dem herkömmlichen ELISA nicht auf Elastase 1 reagierten, konnten nach elektrophoretischer Trennung Proben hergestellt werden, die Elastase enthielten. Die weitere Charakterisierung ergab, daß es sich bei diese Proteinen um verschiedene Isoenzyme handelt, die offensichtlich mit den kommerziellen Testantikörpern nicht erkannt werden. Es gibt offensichtlich

25.05.99

5

für dieses Enzym einen ausgeprägten genetischen Polymorphismus, der sich in der Fachliteratur auch in der Beschreibung von Pankreas-Elastase 1, 2 und 3 widerspiegelt. Durch eigene Untersuchungen konnte auch nachgewiesen werden, daß zumindest 2 Isoenzyme gleichzeitig vorkommen können. Es konnte auch gezeigt werden, daß sich diese Elastasen in ihrer Konzentrationsabhängigkeit zur Pankreasschädigung genauso verhalten, wie die Elastase 1.

Im Gegensatz zu den bekannten Lösungen, die sich auf den spezifischen Nachweis der Pankreas-Elastase 1 beschränken, wurde überraschenderweise gefunden, daß durch den Nachweis möglichst jedoch alle Pankreas-Elastase-Isoformen, bekannt sind derzeit die Pankreas-Elastasen 1, 2 und 3, die Aussagefähigkeit im Bezug auf die Pankreasfunktion entscheidend verbessert werden kann. Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von anti-Elastase-Antikörpern auf übliche Weise, das jedoch dadurch gekennzeichnet ist, daß die verwendeten spezifischen Antigene einzeln oder in Kombination alle bekannten Elastase-Isoenzyme oder Teilstücke von diesen oder kreuzreagierende synthetische Sequenzen repräsentieren.

Teilstücke werden vorzugsweise durch Peptidsynthese gewonnen, wobei die Aminosäuresequenz vorher mittels strukturanalytischer Methoden aus der Gesamtsequenz abgeleitet oder nach Proteinsequenzierung ermittelt wird. Wenngleich die Peptide bereits allein eine Antikörperinduktion auslösen, hat es sich erfindungsgemäß als zweckmäßig erwiesen, diese Peptide an übliche Carriersubstanzen wie Hämocyanin zu binden. Mit den erfindungsgemäßen Peptiden ist es möglich, monoklonale wie polyklonale Antikörper zu erzeugen.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen polyklonalen Antipeptidantikörper werden Versuchstiere wie Kaninchen, Meerschweinchen, Ziegen, Hühner oder Fische in bekannter Weise mit den Peptiden immunisiert. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper werden die Peptide in bekannter Weise für die Induktion spezifischer B-Zellen verwendet, die nach

Fusionierung mit Myelomzellen Hybridomzellen generieren, die nach bekannten Klonierungsverfahren in Zelllinien kultiviert werden, die spezifische monoklonale Antikörper sezernieren. Die erfindungsgemäßen mono- oder polyklonalen Antikörper reagieren nur mit dem verwendeten spezifischen Epitopen bzw. mit allen bekannten Elastase-Isoenzymen.

Es konnte nachgewiesen werden, daß Antikörper gegen die Peptide A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N, G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q, G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I, H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V, W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A, V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T, G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q, S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N, K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D, G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W, G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L, S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y, F-G-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T, hochspezifisch mit den Isoformen der Pankreas-Elastase reagieren und keine unspezifische Reaktion mit anderen Stuhlbestandteilen eingehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Elastase-Antikörper für den Nachweis und die Quantifizierung aller bekannter Elastase-Isoenzyme in Körperflüssigkeiten und Stuhl. Die Erfindung betrifft daher auch Nachweissysteme, vorzugsweise ein immunchemisches Nachweissystem zur Feststellung der Funktionalität des Pankreas als Hilfsmittel zur Erkennung von Funktionsstörungen dieses Organs. Dazu können die spezifischen Antikörper an jeden geeigneten Träger adsorptiv oder chemisch mit bekannten Kopplungsverfahren gebunden werden. Als Träger eignen sich Membranen oder Partikel. Mit einem erfindungsgemäßen Sandwich-ELISA unter Verwendung von kreuzreaktiven oder einer Kombination unterschiedlicher Epitopantikörper lassen sich schnell und spezifisch Pankreas-Elastase in Stuhl und Serum bzw. Plasma nachweisen und quantifizieren.

Er dient zur Diagnose bzw. dem Ausschluß einer Pankreasbeteiligung bei Abdominalbeschwerden und exokriner Pankreasinsuffizienz.

Es gibt auch Fälle, in denen bereits die Erfassung von Elastase 1 genügt, um eine sichere Diagnose von Pankreasstörungen

stellen zu können. In diesen Fällen wird das erfindungsgemäße Verfahren folgendermaßen geführt:

Die DNA-Sequenz für humane Elastase 1 (JP 1987000276-A/6) wurde in die Aminosäuresequenz übertragen. Unter Verwendung üblicher Proteinstrukturprogramme konnten mehrere Aminosäuresequenzen identifiziert werden, die eine potentielle Epitopstruktur aufweisen. Es konnte nachgewiesen werden, daß Antikörper gegen die Peptide A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N und G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q hochspezifisch Elastase 1 binden und keine unspezifische Reaktion mit anderen Stuhlbestandteilen eingehen.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von anti-Elastase-Antikörpern auf übliche Weise, das jedoch dadurch gekennzeichnet ist, daß die verwendeten spezifischen Antigene zuvor mittels strukturanalytischer Methoden aus der Aminosäuresequenz abgeleitet und chemisch synthetisiert wurden. Erfindungsgemäß ist es auch möglich, Teile dieser synthetischen Peptide für die Herstellung von Antikörpern zu verwenden. Wenngleich die Peptide allein eine Antikörperinduktion auslösen, hat es sich erfindungsgemäß als zweckmäßig erwiesen, diese Peptide an übliche Carriersubstanzen wie Hämocyanin zu binden. Mit den erfindungsgemäßen Peptiden ist es möglich, sowohl monoklonale wie polyklonale Antikörper zu erzeugen.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen polyklonalen Antipeptidantikörper werden Versuchstiere wie Kaninchen, Meerschweinchen, Ziegen, Hühner oder Fische in bekannter Weise mit den Peptiden immunisiert. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper werden die Peptide in bekannter Weise für die Induktion spezifischer B-Zellen verwendet, die nach Fusionierung mit Myelomzellen Hybridomzellen generieren, die nach bekannten Klonierungsverfahren in Zelllinien kultiviert werden, die spezifische monoklonale Antikörper sezernieren. Die erfindungsgemäßen mono- oder polyklonalen Antikörper reagieren nur mit dem verwendeten spezifischen Epitop bzw. der reifen Elastase 1.

25.05.99
10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Elastase 1-epitopspezifischen Antikörper für den Nachweis und die Quantifizierung von Elastase 1 in Körperflüssigkeiten und Stuhl. Die Erfindung betrifft daher auch ein immunchemisches Nachweissystem zur Feststellung der Funktionalität des Pankreas als Hilfsmittel zur Erkennung von Funktionsstörungen dieses Organs. Dazu können die spezifischen Antikörper an jeden geeigneten Träger adsorptiv oder chemisch mit bekannten Kopplungsverfahren gebunden werden. Als Träger eignen sich Membranen oder Partikel. Mit einem erfindungsgemäßen Sandwich-ELISA unter Verwendung von je zwei unterschiedlichen Epitopantikörpern läßt sich schnell und spezifisch Elastase 1 in Stuhl und Serum bzw. Plasma nachweisen und quantifizieren.

Ausführungsbeispiel 1 - Herstellung spezifischer anti-Peptid-Antikörper, die gegen definierte Abschnitte der reifen humanen Elastase 1 gerichtet sind.

Mittels Festphasensynthese nach Merrifield werden die Peptide mit den Aminosäuresequenzen $\text{NH}_2\text{-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH}$ und $\text{NH}_2\text{-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH}$ synthetisiert. Die Peptide werden mit bekannten Verfahren an Napfschneckenhäemocyanin (KLH) gekoppelt (1 mg Peptid/mg KLH). Je 300 μg dieses Konjugates werden unter Zusatz von Freundschens Adjuvants für die Immunisierung von Kaninchen bzw. Huhn verwendet. Nach 3maliger Vakzination werden die Tiere entblutet. Nach Gewinnung des Serums wird die Spezifität der Antiseren in einem ELISA getestet. Dazu wird freies Peptid an die Oberfläche der Kavitäten von Mikrotiterplatten adsorbiert. Nach Inkubation der Kavitäten mit den Antiseren werden diese gründlich gewaschen. Unter Verwendung von Antikaninchen- bzw. Antihuhn-POD-Konjugat und TMB als Substrat werden in üblicher Weise die Antigen-Antikörperreaktion detektiert. Jedes Antiserum reagiert nur mit dem homologen Peptid.

Ausführungsbeispiel 2 - Nachweis der Spezifität der erfindungsgemäßen Antikörper

E Elastase 1 - Spezifität kann im Westernblot nachgewiesen werden. Dazu werden grob- bzw. hochgereinigte Elastase 1 aus Stuhl mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese entsprechend ihrer relativen Molmasse von begleitenden Verunreinigungen getrennt. Die Proteinzonen aus dem Gel werden mit Hilfe einer "Semidry-blotting"-Apparatur auf Nitrozellulose übertragen. Nach Absättigung der freien Bindungsstellen der Membran mit resuspendierter Trockenmagermilch werden die Membranen mit den 1 : 500 verdünnten anti-Peptid-Antiseren inkubiert. Nach intensiven Waschen der Membranen zur Entfernung aller unspezifisch gebundenen Antikörper werden die Membranen mit Phosphatase - markierten anti-Kaninchen-Antikörpern inkubiert.

Die spezifisch gebundenen sekundären Antikörper, die nach Waschen auf der Membran verblieben, werden nach Zugabe des Substrates sichtbar gemacht. Dabei zeigt sich, daß in den verwendeten Proben ausschließlich Elastase nachgewiesen wurde.

Ausführungsbeispiel 3 - Bestimmung der Elastase 1 in Stuhl unter Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper in einem ELISA

Die Elastase 1 in Serumproben oder in Stuhlproben wird in einem Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert, bestimmt. Ein polyklonaler Antikörper, der gegen Epitope der Elastase 1 gerichtet ist, wird in einem Karbonat/Bikarbonat-Puffergemisch, pH 9,6 gelöst und in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach der Inkubation bei 4 °C über 12 h werden die nicht gebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Die noch freien Bindungsstellen des Trägermaterials werden durch einen PBS-Puffer, der Ethanol-amin und Tween 20 enthält, geblockt. Das Blocken findet bei Raumtemperatur über 90 min statt. Nach dem Waschen werden die in PBS verdünnten Serum- bzw. Stuhlproben in die Wells pipettiert. Die 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wird durch Waschen beendet. Ein zweiter Elastase 1 spezifischer polyklonaler Antikörper, der mit Biotin konjugiert ist, wird zu der an den ersten Antikörper gebundenen Elastase gegeben.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten und dem Waschprozeß wird der biotinmarkierte Antikörper mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin nachgewiesen. Durch den letzten Waschschrift erfolgt die Beseitigung des nicht gebunden Streptavidins. Anschließend wird TMB als Substrat für die Peroxidase dazugegeben und nach einer definierten Zeit wird die Farbreaktion durch Zugabe von HCl abgestoppt. Gemessen wird die Änderung der optischen Dichte. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Elastase 1-Konzentration der Probe.

Ausführungsbeispiel 4 - Herstellung spezifischer anti-Peptid-Antikörper, die gegen definierte Abschnitte von Isoformen der Pankreas-Elastase gerichtet sind.

Mittels Festphasensynthese nach Merrifield werden die Peptide mit den Aminosäuresequenzen A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N, G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q, G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I, H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V, W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A, V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T, G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q, S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N, K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D, G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W, G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L, S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y, F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T synthetisiert. Die Peptide werden mit bekannten Verfahren an Kapfschneckenhäemocyanin (KLH) gekoppelt (1 mg Peptid/mg KLH). Je 300 µl dieses Konjugates werden unter Zusatz von Freundschens Adjuvants für die Immunisierung von Kaninchen oder Huhn verwendet. nach dreimaliger Vakzination werden die Tiere entblutet. Nach Gewinnung der Antikörper (Reinigung über Protein A-Säule bzw. fraktionierte Fällung) wird ihre Spezifität in einem ELISA getestet. Dazu wird freies Peptid an die Oberfläche der Kavitäten von Mikrotiterplatten adsorbiert. Nach Inkubation der Kavitäten mit den homologen bzw. heterologen Antikörpern werden diese gründlich gewaschen. Unter Verwendung von Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Huhn-POD-Konjugaten und TMB als Substrat werden in üblicher Weise die Antigen-Antikörper-Reaktionen detektiert. Jeder Antikörper reagiert nur mit dem homologen Peptid.

Ausführungbeispiel 5 - Nachweis der Spezifität der erfindungsgemäßen Antikörper

Die Spezifität der Antikörper für verschiedene Isoformen der Pankreas-Elastase kann im Western-Blot nachgewiesen werden. Dazu werden grob- und hochgereinigte Elastaseproben aus Stuhl und Pankreassaft mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer relativen Molmasse von begleitenden Verunreinigungen getrennt. Die Proteinzonen aus dem Gel werden mit Hilfe einer "semi-dry"-Blottingapparatur auf Nitrozellulose

übertragen. Nach Absättigung der freien Bindungsstellen der Membran mit resuspendierter Trockenmagermilch werden die Membranen mit den jeweiligen vorverdünnten anti-Peptid-Antikörper alleine oder in unterschiedlicher Kombination inkubiert. Nach intensivem Waschen der Membranen zur Entfernung aller unspezifisch gebundener Antikörper werden die Membranen mit alkalischer Phosphatase-markierten anti-Kaninchen-Antikörpern in einer vorher ermittelten Konzentration inkubiert. Die spezifischen sekundären Antikörper, die nach dem Waschen auf der Membran verbleiben, werden nach Zugabe von Substrat sichtbar gemacht. Dabei zeigte sich, dass in allen Proben mit einzelnen Antikörpern oder Antikörpergemischen Elastase detektiert werden kann, jedoch nicht jeder Antikörper alle Isoformen detektiert.

Ausführungsbeispiel 6 - Bestimmung der Pankreas-Elastase in Stuhl und Serum unter Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper.

Die Elastase in Serum, Plasma oder Stuhl wird mit einem Festphasen-ELISA, der auf der Sandwichtechnik basiert, bestimmt. Dazu werden einzelne oder ein entsprechendes Gemisch mehrerer der erfindungsgemäßen Antikörper in einem Karbonat/Bikarbonat-Puffergemisch, pH 9,6 gelöst und in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation bei 4 °C werden die nicht gebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Die noch freien Bindungsstellen des Trägermaterials werden durch einen Ethanolamin/Tween 20-PBS-Puffer geblockt. Das Blocken findet bei Raumtemperatur über 90 Minuten statt. Nach dem Waschen werden die in PBS verdünnten Serum- bzw. Stuhlproben in die Wells pipettiert. Die 60minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird durch Waschen beendet. Als Detektionsantikörper werden einzelne oder ein entsprechendes Gemisch aus mehreren erfindungsgemäßen Antikörpern verwendet, die mit Biotin konjugiert wurden. Nach einer Inkubation von 30 Minuten und dem Waschprozeß wird der Biotin-markierte Antikörper mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin nachgewiesen. Durch den letzten Waschschrift erfolgt die

25.05.99

15

13

Beseitigung des nicht gebundenen Streptavidins. Anschließend wird mit TMB als Substrat die Peroxidasekonzentration bestimmt. Nach Zugabe von HCl zur Beendigung der Enzymreaktion wird die Änderung der optischen Dichte gemessen. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Elastase-Konzentration in der Probe.

25.05.99
2

14

Patentansprüche

Patentansprüche:

1. Diagnostisches Verfahren zur Erkennung einer Pankreasfunktionsstörung, dadurch gekennzeichnet, daß in Serum, Se- oder Exkreten eines Patienten der Gesamtgehalt aller pankreatischen Elastasen (Isoenzyme) bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung vorzugsweise mittels immunchemischer Systeme unter Nutzung mono- oder polyklonaler Antikörper, die alle Elastase-Isoenzyme einzeln spezifisch oder kreuzreaktiv erkennen, mit Ausnahme der Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg, erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzten Antikörper mittels Antigenen gewonnen werden, die die kompletten Elastasen 1, 2 und 3 oder Untereinheiten davon darstellen mit Ausnahme der Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg oder einer immunologisch wirksamen Teilsequenz davon.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Antigene synthetische Peptide verwendet werden, die nach Immunisierung von Tieren Antikörper induzieren, die kreuzreaktiv mehrere Elastasen erkennen, mit Ausnahme der Aminosäuresequenz Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg.
5. Verfahren nach Anspruch 1 - 4 dadurch gekennzeichnet, daß vorzugsweise folgende synthetische Peptide verwendet werden
NH₂-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH
NH₂-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH
NH₂-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH
NH₂-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH
NH₂-G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I-COOH
NH₂-H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V-COOH

25.05.99

15

NH₂-W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A-COOH
NH₂-V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T-COOH
NH₂-G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q-COOH
NH₂-S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N-COOH
NH₂-K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D-COOH
NH₂-G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W-COOH
NH₂-G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L-COOH
NH₂-S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y-COOH
NH₂-F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T-COOH

6. Verfahren nach Ansprüchen 1 - 5 dadurch gekennzeichnet, daß Antikörper einzeln oder in einer Kombination in immunchemischen Nachweissystemen verwendet werden.

7. Immunologische Testkits zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse unter Verwendung von Stuhl oder Körperflüssigkeiten, enthaltend Antikörper gemäß den Ansprüchen 2-6.

8. Verfahren zur Gewinnung von mono- und/oder polyklonalen Antikörpern, die spezifisch mit humaner Elastase 1 in Stuhl oder Körperflüssigkeiten reagieren und durch übliche Immunisierungsverfahren dadurch gekennzeichnet, daß man die Peptide

A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N und G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q oder immunogene Teilpeptide davon als Antigen zur Immunisierung von Vertebraten, insbesondere von Kleinsäugetern und Vögeln, verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die freien Peptide vor der Immunisierung an geeignete Trägersubstanzen, vorzugsweise Hämocyanin oder Albumin koppelt.

10. Verfahren nach Anspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß polyklonale Antikörper unter Einsatz von Hühnern als Versuchstieren produziert werden.

25.05.99
4

16

11. Polyklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 8 bis 10 hergestellt wurden.

12. Monoklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 8 und 9 hergestellt wurden.

13. Peptid A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N

14. Peptid Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R

15. Peptid R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N

16. Peptid G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q

17. Reinigungs- und Detektionssysteme für humane Elastase 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest einen der erfindungsgemäßen Antikörper enthalten.

18. Immunologische Testkits nach Anspruch 17 zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse und der Mucoviscidose unter Verwendung von Stuhl oder Körperflüssigkeiten.

19. Immunologische Testkits nach Anspruch 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß 2 unterschiedliche Antikörper verwendet werden (Sandwich-ELISA).

Verfahren zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen humane Elastase 1 und deren Nutzung in Nachweissystemen

H.-W. Heinrich, H.-J. Wagner, R. Kleinert, U. Meyer

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen humane Elastase 1 beschrieben. Das Ziel wird erfindungsgemäß durch die Verwendung synthetischer Peptide mit den Aminosäuresequenzen

1. $\text{NH}_2\text{-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH}$
2. $\text{NH}_2\text{-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH}$
3. $\text{NH}_2\text{-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH}$
4. $\text{NH}_2\text{-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH}$

erreicht, die, an geeignete Carrierproteine gekoppelt, als Antigene im Tier eine spezifische Antikörperantwort induzieren. Diese Antikörper bilden die Grundlage für die Herstellung von Testsystemen für den spezifischen Nachweis von humaner Elastase 1.

25.05.99

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von mono- und/oder polyklonalen Antikörpern, die spezifisch mit humaner Elastase 1 in Stuhl oder Körperflüssigkeiten reagieren und durch übliche Immunisierungsverfahren dadurch gekennzeichnet, daß man die Peptide

A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R,
R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N und G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q oder
immunogene Teilpeptide davon als Antigen zur Immunisierung
von Vertebraten, insbesondere von Kleinsäugetern und Vögeln,
verwendet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
man die freien Peptide vor der Immunisierung an geeignete
Trägersubstanzen, vorzugsweise Hämocyanin oder Albumin
koppelt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet,
daß polyklonale Antikörper unter Einsatz von Hühnern als
Versuchstieren produziert werden.

4. Polyklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 1 und
ggf. 2 und 3 hergestellt wurden.

5. Monoklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 1 und
ggf. 2 hergestellt wurden.

6. Peptid A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N

7. Peptid Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R

8. Peptid R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N

9. Peptid G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q

23.05.99

10. Reinigungs- und Detektionssysteme für humane Elastase 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest einen der erfindungsgemäßen Antikörper enthalten.

11. Immunologische Testkits nach Anspruch 10 zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse und der Mucoviscidose unter Verwendung von Stuhl oder Körperflüssigkeiten.

12. Immunologische Testkits nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß 2 unterschiedliche Antikörper verwendet werden (Sandwich-ELISA).

25.05.99

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen humane Elastase 1 und deren Nutzung in Nachweissystemen. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Entzündungen der Bauchspeicheldrüse stellen ein beträchtliches Gesundheitsrisiko für den Patienten dar. Während akut verlaufende Entzündungen auf Grund der schweren Symptomatik mit invasiven und nichtinvasiven diagnostischen Methoden rasch erkannt werden können, ist bei chronischen Verlaufsformen die Diagnose durch fehlende Möglichkeiten einer morphologischen und histologischen Verifizierung erschwert. Sie basiert neben der Bewertung klinischer Symptome auf funktionellen Parametern wie Verdauungsstörungen, Gewichtsverlust und Diabetes mellitus. Bei klinischem Verdacht auf Vorliegen einer chronischen Pankreasentzündung ist der Nachweis einer verminderten Leistungsfähigkeit (exokrine Pankreasinsuffizienz) für die differenzialdiagnostische Absicherung wichtig.

In den letzten Jahren hat sich der Nachweis von Elastase 1 im Stuhl als wichtiger Parameter für den indirekten Pankreasfunktionstest durchgesetzt. Die Elastase 1 ist ein proteolytisches pankreasspezifisches Enzym, das in großen Mengen in das Duodenum ausgeschieden wird und dort eine wichtige Verdauungsfunktion ausübt. Elastase 1 wird während der Darmpassage offensichtlich nicht abgebaut. Es kann unter Verwendung spezifischer Antikörper leicht immunchemisch mittels Enzymimmunassay (ELISA) oder Radioimmunassay (RIA) im Stuhl nachgewiesen werden. Die Enzymkonzentration im Stuhl zeigt somit den Funktionsgrad des exokrinen Pankreas an. Chronische Pankreasentzündungen, die mit einer exokrinen Insuffizienz einher gehen, können durch eine stark reduzierte Elastase 1 - Konzentration im Stuhl erkannt werden, während eine akute Pankreasentzündung durch den raschen Zerfall funktionellen Gewebes zu einem Anstieg von Elastase 1 im Plasma führt.

38.05.99

Für die Bestimmung von Elastase 1 stehen ein RIA (MURATA, A. et al., Enzyme 30, 29-37; 19983) und ein ELISA (EP 0 547 059 B1) zur Verfügung. Beide Teste haben sich in der Diagnostik bewährt. Der RIA hat jedoch in der Herstellung und Handhabung alle Nachteile von Systemen, die mit offener Radioaktivität arbeiten (Halbwertszeit, spezielle Laboratorien, besonders ausgebildetes Personal, aufwendige Entsorgung). Der ELISA ist gegen Epitope gerichtet, die Elastase-spezifisch sind, aber im funktionellen Enzym nicht oder nicht mehr vorkommen. Dadurch werden bei der Bestimmung der Elastase-Konzentration in solchen Fällen (wenn ein Anteil an funktionellem Enzym vorhanden ist) ungenaue Werte erhalten.

Die Erfindung hat daher zum Ziel, ein Testverfahren bereitzustellen, mit dessen Hilfe funktionelle Elastase 1 in Stuhl, Serum oder Plasma als Parameter für Entzündungen der Pankreas nachgewiesen werden kann.

Dieses Ziel wird erfindungsgemäß mittels Antikörpern erreicht, die gegen Epitope des reifen Enzyms gerichtet sind. Dazu wurde die DNA-Sequenz für humane Elastase 1 (JP 1987000276-A/6) in die Aminosäuresequenz übertragen. Unter Verwendung üblicher Proteinstrukturprogramme konnten mehrere Aminosäuresequenzen identifiziert werden, die eine potentielle Epitopstruktur aufweisen. Es konnte nachgewiesen werden, daß Antikörper gegen die Peptide A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N und G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q hochspezifisch Elastase 1 binden und keine unspezifische Reaktion mit anderen Stuhlbestandteilen eingehen.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von anti-Elastase-Antikörpern auf übliche Weise, das jedoch dadurch gekennzeichnet ist, daß die verwendeten spezifischen Antigene zuvor mittels strukturanalytischer Methoden aus der Aminosäuresequenz abgeleitet und chemisch synthetisiert wurden. Erfindungsgemäß ist es auch möglich, Teile dieser synthetischen Peptide für die Herstellung von Antikörpern zu verwenden. Wenngleich die Peptide allein eine Antikörperinduktion auslösen, hat es sich erfindungsgemäß als zweckmäßig erwiesen, diese Peptide an übliche Carriersubstanzen wie Hämocyanin zu

28.05.99

binden. Mit den erfindungsgemäßen Peptiden ist es möglich, sowohl monoklonale wie polyklonale Antikörper zu erzeugen.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen polyklonalen Antipeptidantikörper werden Versuchstiere wie Kaninchen, Meerschweinchen, Ziegen, Hühner oder Fische in bekannter Weise mit den Peptiden immunisiert. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper werden die Peptide in bekannter Weise für die Induktion spezifischer B-Zellen verwendet, die nach Fusionierung mit Myelomzellen Hybridomzellen generieren, die nach bekannten Klonierungsverfahren in Zelllinien kultiviert werden, die spezifische monoklonale Antikörper sezernieren. Die erfindungsgemäßen mono- oder polyklonalen Antikörper reagieren nur mit dem verwendeten spezifischen Epitop bzw. der reifen Elastase 1.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Elastase 1-epitopspezifischen Antikörper für den Nachweis und die Quantifizierung von Elastase 1 in Körperflüssigkeiten und Stuhl. Die Erfindung betrifft daher auch ein immunchemisches Nachweissystem zur Feststellung der Funktionalität des Pankreas als Hilfsmittel zur Erkennung von Funktionsstörungen dieses Organs. Dazu können die spezifischen Antikörper an jeden geeigneten Träger adsorptiv oder chemisch mit bekannten Kopplungsverfahren gebunden werden. Als Träger eignen sich Membranen oder Partikel. Mit einem erfindungsgemäßen Sandwich-ELISA unter Verwendung von je zwei unterschiedlichen Epitopantikörpern läßt sich schnell und spezifisch Elastase 1 in Stuhl und Serum bzw. Plasma nachweisen und quantifizieren.

Ausführungsbeispiele 1 - Herstellung spezifischer anti-Peptid-Antikörper, die gegen definierte Abschnitte der reifen humanen Elastase 1 gerichtet sind.

Mittels Festphasensynthese nach Merrifield werden die Peptide mit den Aminosäuresequenzen $\text{NH}_2\text{-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH}$ und $\text{NH}_2\text{-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH}$ synthetisiert. Die Peptide werden mit bekannten Verfahren an Napfschneckenhäemocyanin (KLH) gekoppelt (1 mg Peptid/mg KLH). Je 300 µg dieses Konjugates werden unter Zusatz von Freundschens Adjuvants für die Immunisierung von Kaninchen bzw. Huhn verwendet. Nach 3maliger Vakzination werden die Tiere entblutet. Nach Gewinnung des Serums wird die Spezifität der Antiseren in einem ELISA getestet. Dazu wird freies Peptid an die Oberfläche der Kavitäten von Mikrotiterplatten adsorbiert. Nach Inkubation der Kavitäten mit den Antiseren werden diese gründlich gewaschen. Unter Verwendung von Antikaninchen- bzw. Antihuhn-POD-Konjugat und TMB als Substrat werden in üblicher Weise die Antigen-Antikörperreaktion detektiert. Jedes Antiserum reagiert nur mit dem homologen Peptid.

Ausführungsbeispiel 2 - Nachweis der Spezifität der erfindungsgemäßen Antikörper

Die Elastase 1 - Spezifität kann im Westernblot nachgewiesen werden. Dazu werden grob- bzw. hochgereinigte Elastase 1 aus Stuhl mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese entsprechend ihrer relativen Molmasse von begleitenden Verunreinigungen getrennt. Die Proteinzonen aus dem Gel werden mit Hilfe einer "Semidry-blotting"-Apparatur auf Nitrozellulose übertragen. Nach Absättigung der freien Bindungsstellen der Membran mit resuspendierter Trockenmagermilch werden die Membranen mit den 1 : 500 verdünnten anti-Peptid-Antiseren inkubiert. Nach intensiven Waschen der Membranen zur Entfernung aller unspezifisch gebundenen Antikörper werden die Membranen mit

Phosphatase - markierten anti-Kaninchen-Antikörpern inkubiert. Die spezifisch gebundenen sekundären Antikörper, die nach Waschen auf der Membran verblieben, werden nach Zugabe des Substrates sichtbar gemacht. Dabei zeigt sich, daß in den verwendeten Proben ausschließlich Elastase nachgewiesen wurde.

Ausführungsbeispiel 3 - Bestimmung der Elastase 1 in Stuhl unter Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper in einem ELISA

Die Elastase 1 in Serumproben oder in Stuhlproben wird in einem Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert, bestimmt. Ein polyklonaler Antikörper, der gegen Epitope der Elastase 1 gerichtet ist, wird in einem Karbonat/Bikarbonat-Puffergemisch, pH 9,6 gelöst und in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach der Inkubation bei 4 °C über 12 h werden die nicht gebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Die noch freien Bindungsstellen des Trägermaterials werden durch einen PBS-Puffer, der Ethanol-amin und Tween 20 enthält, geblockt. Das Blocken findet bei Raumtemperatur über 90 min statt. Nach dem Waschen werden die in PBS verdünnten Serum- bzw. Stuhlproben in die Wells pipettiert. Die 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wird durch Waschen beendet. Ein zweiter Elastase 1 spezifischer polyklonaler Antikörper, der mit Biotin konjugiert ist, wird zu der an den ersten Antikörper gebundenen Elastase gegeben.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten und dem Waschprozeß wird der biotinmarkierte Antikörper mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin nachgewiesen. Durch den letzten Waschschrift erfolgt die Beseitigung des nicht gebundenen Streptavidins. Anschließend wird TMB als Substrat für die Peroxidase dazugegeben und nach einer definierten Zeit wird die Farbreaktion durch Zugabe von HCl abgestoppt. Gemessen wird die Änderung der optischen Dichte. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Elastase 1-Konzentration der Probe.